

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 20520061151918

UDC\_\_\_\_\_

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

# 基于构建液相芯片的聚苯乙烯微球的合成 及应用

Synthesis and Application of Monodisperse Polystyrene  
Microspheres based on Liquid Biochips

秦学

指导教师姓名: 周雷激 副教授

专 业 名 称: 分析化学

论文提交日期: 2009 年 月

论文答辩时间: 2009 年 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2009 年 8 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人：

年        月        日

# 目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	I
第一章 绪 论 .....	1
1.1 液相芯片.....	1
1.2 聚苯乙烯微球的合成 .....	2
1.3 本论文研究设想 .....	10
参考文献.....	11
第二章 聚苯乙烯微球的合成及表征 .....	18
2.1 引言.....	18
2.2 合成部分.....	18
2.2.1 仪器与试剂.....	18
2.2.2 实验步骤.....	19
2.3 聚苯乙烯微球的表征 .....	20
2.3.1 微球平均粒径及单分散性的表征.....	20
2.3.2 微球表面形貌的表征.....	21
2.3.3 交联微球的热熔性表征.....	21
2.4 结果与讨论.....	21
2.4.1 逐滴加单体与一次加料对微球的平均粒径及单分散性的影响.....	22
2.4.2 单体的用量对微球平均粒径及单分散性的影响.....	24
2.4.3 反应介质极性对微球平均粒径及其单分散性的影响.....	26
2.4.4 引发剂的用量对微球平均粒径及单分散性的影响.....	28
2.4.5 稳定剂的用量对微球平均粒径及单分散性的影响.....	30
2.4.6 反应温度对微球平均粒径及单分散性的影响.....	33
2.4.7 交联剂的用量对微球的平均粒径及单分散性的影响.....	34
2.5 本章小结.....	37
参考文献.....	38
第三章 羧基聚苯乙烯微球的合成研究及表征 .....	39

<b>3.1 引言</b>	<b>39</b>
<b>3.2 合成部分</b>	<b>39</b>
3.2.1 仪器与试剂	39
3.2.2 实验步骤	40
<b>3.3 羧基聚苯乙烯微球的表征</b>	<b>40</b>
3.3.1 微球平均粒径及单分散性的表征	40
3.3.2 微球表面形貌的表征	41
3.3.3 微球表面羧基的定性表征	41
3.3.4 微球表面羧基含量的测定	41
<b>3.4 结果与讨论</b>	<b>42</b>
3.4.1 分散共聚合法制备羧基聚苯乙烯微球	42
3.4.2 种子聚合法制备羧基聚苯乙烯微球	42
3.4.3 羧基聚苯乙烯微球表面羧基的定性分析	43
3.4.4 微球表面羧基含量的测定	46
3.4.5 微球表面形貌的表征	46
<b>3.5 本章小结</b>	<b>48</b>
<b>参考文献</b>	<b>49</b>
<b>第四章 氨基聚苯乙烯微球的合成研究及表征</b>	<b>50</b>
<b>4.1 引言</b>	<b>50</b>
<b>4.2 合成部分</b>	<b>50</b>
4.2.1 仪器与试剂	50
4.2.2 实验步骤	51
<b>4.3 氨基聚苯乙烯微球的表征</b>	<b>53</b>
4.3.1 微球平均粒径及单分散性的表征	53
4.3.2 微球表面形貌的表征	53
4.3.3 微球表面氨基的定性分析	53
4.3.4 微球表面氨基含量的测定	53
<b>4.4 结果与讨论</b>	<b>54</b>
4.4.1 两种还原硝基微球方法的效果比较	54

4.4.2 X 射线扫描微探针电子能谱仪检测氨基基团.....	55
4.4.3 氨基微球表面氨基含量的测定.....	56
4.4.4 硝基、氨基微球平均粒径及单分散性的表征.....	57
4.4.5 混酸比对氨基微球平均粒径的影响.....	59
4.4.6 还原剂连二亚硫酸钠的用量对微球表面氨基含量的影响.....	61
4.4.7 氨基微球表面形貌的表征.....	61
<b>4.5 本章小结.....</b>	<b>62</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>63</b>
<b>第五章 基于液相芯片的羧基微球敏感元件制备及应用 .....</b>	<b>64</b>
<b>5.1 引言.....</b>	<b>64</b>
<b>5.2 实验过程.....</b>	<b>64</b>
5.2.1 仪器与试剂.....	64
5.2.2 羧基微球的活化.....	65
5.2.3 羧基微球表面基团有效活化率的表征.....	66
5.2.4 羧基微球表面抗体结合效果的表征.....	66
5.2.5 活化微球检测试剂样品的应用.....	66
<b>5.3 结果与讨论.....</b>	<b>66</b>
5.3.1 羧基微球表面基团的有效活化率.....	66
5.3.2 羧基微球表面的抗体结合效果.....	68
5.3.3 活化的羧基微球检测人血清癌胚蛋白 (CEA) .....	68
<b>5.4 本章小结.....</b>	<b>69</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>70</b>
<b>论文总结.....</b>	<b>71</b>
<b>攻读硕士学位期间发表的论文 .....</b>	<b>72</b>
<b>致 谢.....</b>	<b>73</b>

## Contents

<b>Abstract (in Chinese) .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract (in English).....</b>	<b>I</b>
<b>Chapter 1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1 Liquid chip.....	1
1.2 Synthesis methods of polystyrene microspheres .....	2
1.3 Objectives and contents of the Paper .....	10
References .....	11
<b>Chapter 2 Preparation and characterization of polystyrene micro-</b>	
<b>spheres.....</b>	<b>18</b>
2.1 Introduction.....	18
2.2 Synthesis section.....	18
2.2.1 Instruments and reagents.....	18
2.2.2 Experimental procedures.....	19
2.3 Characterization of polystyrene microspheres.....	20
2.3.1 Average size and size distribution of the carboxyl microspheres .....	20
2.3.2 Surface configuration of microspheres .....	21
2.3.3 Hot melt of crosslinked microspheres.....	21
2.4 Results and discussion .....	21
2.4.1 Effect of different synthesis steps on size and size distribution of microspheres .....	22
2.4.2 Effect of monomer concentration on size and size distribution of microspheres .....	24
2.4.3 Effect of medium polarity on size and size distribution of microspheres .....	26
2.4.4 Effect of initiator concentration on size and size distribution of microspheres .....	28
2.4.5 Effect of stabilizer concentration on size and size distribution of	

microspheres .....	30
2.4.6 Effect of temperature on size and size distribution of microspheres.	33
2.4.7 Effect of crosslinker concentration on size and size distribution of microspheres .....	34
<b>2.5 Conclusion .....</b>	<b>37</b>
<b>References .....</b>	<b>38</b>
<b>Chapter 3 Preparation and characterization of carboxyl functionalized microspheres.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Introduction.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 Synthesis section.....</b>	<b>39</b>
3.2.1 Instruments and reagents.....	39
3.2.2 Experimental procedures.....	40
<b>3.3 Characterization of carboxyl microspheres.....</b>	<b>40</b>
3.3.1 Average size and size distribution of carboxyl microspheres .....	40
3.3.2 Surface configuration of carboxyl microspheres .....	41
3.3.3 Qualitative analysis of the carboxyl group .....	41
3.3.4 Quantitative analysis of the carboxyl group .....	41
<b>3.4 Results and discussion .....</b>	<b>42</b>
3.4.1 Synthesis of carboxyl functionalized microspheres by dispersion co- polymerization .....	42
3.4.2 Synthesis of carboxyl functionalized microspheres by seeded poly- merization.....	42
3.4.3 Qualitative analysis of the carboxyl group .....	43
3.4.4 Quantitative analysis of the carboxyl group .....	46
3.4.5 Surface configuration of carboxyl microspheres .....	46
<b>3.5 Conclusion .....</b>	<b>48</b>
<b>References .....</b>	<b>49</b>
<b>Chapter 4 Preparation and characterization of amino functionalized</b>	



<b>microspheres.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Introduction.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2 Synthesis section.....</b>	<b>50</b>
4.2.1 Instruments and reagents.....	50
4.2.2 Experimental procedures.....	51
<b>4.3 Characterization of amino microsphere .....</b>	<b>53</b>
4.3.1 Average size and size distribution of amino micro-spheres .....	53
4.3.2 Surface configuration of amino microspheres .....	53
4.3.3 Qualitative analysis of the amino group .....	53
4.3.4 Quantitative analysis of the amino group .....	53
<b>4.4 Results and discussion .....</b>	<b>54</b>
4.4.1 Characterization of two different deoxidize methods .....	54
4.4.2 Detecting amino group with X-ray microprobe photoelectron spectroscopy.....	55
4.4.3 Quantitative analysis of the amino group .....	56
4.4.4 Average size and size distribution of nitril and amino microspheres .....	57
4.4.5 Effect of different mix acid proportions on average diameter of nitril and amino microspheres.....	59
4.4.6 Effect of reducer dosage on surface amino capacity of amino microspheres .....	61
4.4.7 Surface configuration of amino microspheres .....	61
<b>4.5 Conclusion .....</b>	<b>62</b>
<b>References .....</b>	<b>63</b>
 <b>Chapter 5 Building up sensitive components of the liquid chips with the carboxyl microspheres.....</b>	 <b>64</b>
<b>5.1 Introduction.....</b>	<b>64</b>
<b>5.2 Experimental section .....</b>	<b>64</b>
5.2.1 Instruments and reagents.....	64
5.2.2 Activation of carboxyl microspheres .....	65

5.2.3 The efficiency of activation of carboxyl microspheres .....	66
5.2.4 Detecting of activation of carboxyl microspheres by fluorescence microscope .....	66
5.2.5 The Application of activated carboxyl microspheres .....	66
<b>5.3 Results and discussion .....</b>	<b>66</b>
5.3.1 Characterization of the efficient activation of the group on the surface of carboxyl microspheres .....	66
5.3.2 Characterization of the combination between the antibody and activated carboxyl microspheres .....	68
5.3.3 Detecting of CEA by activated carboxyl microspheres .....	68
<b>5.4 Conclusion .....</b>	<b>69</b>
<b>References .....</b>	<b>70</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>71</b>
<b>Articles published and communicated .....</b>	<b>72</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>73</b>

## 摘要

本论文开展了基于构建液相芯片的聚苯乙烯微球合成与应用研究。在液相芯片中,聚苯乙烯微球是一种优良的敏感元件载体。在聚苯乙烯微球表面引入羧基、氨基、羟基或者其它官能团,可用于核酸、蛋白质等生物大分子的固定化,进而应用于高通量、高特异性的生物化学分析和检测,如肿瘤标志物的筛查等。

商品化的聚苯乙烯微球及其制备方法,因其应用领域或者用途的不同而在性能指标和制备条件方面存在较大的差异。目前商品化的聚苯乙烯微球用作液相芯片敏感元件载体不够理想,如国内的产品通常存在非特异性吸附严重、活化效果不好等问题,而国外的如 Luminex、Bangs Laboratories、Spherotech、Duke Scientific 等公司产品通常价格非常昂贵,不适于研究工作的长期开展。

论文第一章介绍液相芯片的发展及其应用,列举和对比了聚苯乙烯微球的各种合成方法。根据液相芯片应用的需要确定利用分散聚合法合成聚苯乙烯微球,并重点探讨了利用分散聚合法合成聚苯乙烯微球的原理及其优缺点。

第二章为聚苯乙烯微球的合成及表征。重点讨论了各种反应物的用量、反应时间、反应温度、搅拌速度等多种反应条件对合成微球的粒径大小及单分散性的影响。利用多种方法对合成的空白聚苯乙烯微球的平均粒径、单分散性、表面结构、孔径分布进行了细致的表征,并获得了优化条件,合成了 2.2  $\mu\text{m}$  左右的单分散性聚苯乙烯微球。

第三章为羧基聚苯乙烯微球的制备及表征。比较了分散共聚法和种子修饰法得到的微球的性能参数,利用种子修饰法合成了表面羧基含量高、表面相对光滑、致密的单分散性聚苯乙烯羧基微球。

第四章为氨基聚苯乙烯微球的制备及表征。首先在已经合成的空白微球表面进行硝基化,然后分别在碱性条件下采用连二亚硫酸钠还原法、在酸性条件下采用金属还原法制备氨基微球,通过比较两种氨基微球的性能,确立了实验方案。最后利用电导滴定测量了氨基微球表面氨基含量,并对其表面孔径分布进行了表征,得到了表面致密的微米级单分散性聚苯乙烯氨基微球。

第五章分别用羧基二咪唑(1, 1'-Carboxyl-diimidazole, CDI)法和酰肼法活化羧基微球,然后通过茚三酮显色法表征了活化效果。开展了活化微球的抗体固定化研究与应用。并利用活化微球检测了人血清癌胚蛋白(CEA)。

本论文的成果是针对构建液相芯片敏感元件的载体,利用分散聚合法合成了微米级单分散性聚苯乙烯微球,并在聚苯乙烯微球的表面分别引入羧基及氨基基团,成功制备了基于液相芯片的聚苯乙烯微球敏感元件,并利用活化的微球应用于检测人血清癌胚蛋白(CEA)。

**关键词:** 聚苯乙烯; 羧基微球; 氨基微球; 液相芯片

## Abstract

In this thesis, synthesis and application of functional monodisperse polystyrene microspheres based on liquid biochips is presented. The polystyrene microspheres are one of the excellent carriers of the liquid-chip sensing units. The introduction of carboxyl, amino, hydroxyl or other functional groups of biological, liquid components to the surface of polystyrene beads can be applied to sensor chips, so as to conduct high-throughput, high specificity analysis and test of nucleic acids, proteins and other biological macromolecules, such as screening tumor markers.

The commercial polystyrene microsphere and its preparation method vary in parameter, regarding to different fields and purposes. At present, performance parameters of the commercial polystyrene microsphere are not ideal enough when building up the carrier of sensitive components of Liquid-Biochip. For example, there exists serious non-specific adsorption and poor activation effect for the domestic microspheres. On the other hand, the price of abroad ones from the company of Luminex、Bangs Laboratories、Spherotech、Duke Scientific and so on is usually much higher. All these factors make it not suitable for the development and long-term research of Liquid-Biochip.

Chapter I of this thesis briefly introduces the development of liquid-chip and its application, and then lists and estimates various preparation methods of polystyrene microspheres. Finally we decide to synthesize the polystyrene microsphere with dispersion polymerization regarding to the requirement of applying the liquid-chip, and we specially focus on investigating the principle of synthesizing polystyrene microspheres with dispersion polymerization and its advantages and disadvantages.

The main work of chapter II is the synthesis and characterization of the polystyrene microsphere. We focus on discussing a variety of factors including the effect of the amount of reactants, reaction time, reaction temperature, and stirring speed affecting the particle size and size distribution. And then we apply various methods to characterize the average size, size distribution, surface structure and pore size distribution of polystyrene microspheres. Eventually we find out the best

conditions for the synthesis of 2.2  $\mu\text{m}$  mono-dispersed polystyrene microspheres.

The carboxyl polystyrene microsphere is an important carrier for the liquid-chip. So its preparation and characterization are very important. In chapter III we compare the difference between copolymerization and seed modified dispersion polymerization. The surface of particles obtained from the latter method is rich in carboxyl groups. The carboxyl group can be activated to bind with the antibody. The microspheres binded with antibody can capture the target molecule which then binds with fluorescence molecules. We applied this method to detect the carcinoembryonic antigen (CEA) in chapter V, and aquire a good result.

In chapter IV we describe the Preparation and Characterization of the amino polystyrene microsphere. First of all, we linked nitril group to the surface of the blank microsphere with nitric acid, and then investigated the effect of the two deoxidize methods. Finally, we found out that the method of using sodium dithionite to reduce nitril group into amino group can obtain dense monodispersed microspheres rich in surface amino groups.

In chapter V we activated the amino microspheres with CDI and adipic dihydrazide (AADH) separately, characterized the activation effect with Ninhydrin color printing method, and then evaluated its ability coupling to the antibody with Coomassie brilliant blue (CBB) G250. Finally we detected human serum carcinoembryonic antigen proteins with the activated microsphere and a good result had been obtained.

The result of this paper consummates a method of obtaining monodispersed, micrometer and dense surface structure polystyrene microspheres. And then we successfully bind the carboxyl and amino group to the surface of the microsphere. At last we detect the carcinoembryonic antigen (CEA) by carboxyl microspheres.

**Key Words:** Polystyrene; carboxyl microspheres; amino microspheres; liquid chips

## 第一章 绪论

### 1.1 液相芯片

生物芯片是在上世纪九十年代,随着人类对“人类基因组计划”(Human Genome Project, HGP)及蛋白质组计划(Human Proteome Project, HPP)研究的深入,应运而生的一种结合化学、生物学、物理学、微电子学及计算机科学等多门学科而产生的一种新技术<sup>[1-3]</sup>。生物芯片主要是通过微加工和微电子技术,在固体芯片表面构建生物化学分析系统,从而可以实现对抗体、核酸等生物大分子的高效、快速、高通量、集成化检测<sup>[4-5]</sup>。生物芯片最初来自于美国 Affymetrix 公司的前身 Affymax 公司的一次很有创意的建议,经过不断尝试,已实现在基因测序<sup>[6]</sup>、基因表达分析<sup>[7]</sup>、蛋白质相互作用研究<sup>[8]</sup>、疾病诊断<sup>[9]</sup>等方面的应用。由于生物芯片可以实现同时检测多种疾病或者分析多种生物成分的目的<sup>[10-13]</sup>,因此越来越受到科研工作者的重视。

生物芯片主要包括基因芯片(gene-chip)、蛋白质芯片(protein-chip)和组织芯片(tissue-chip)等。按寻址方式和最终检测载体又可分为固相芯片(flat microarrays)<sup>[14]</sup>和液相芯片(liquid chip or microsphere arrays)<sup>[15]</sup>。

液相芯片将流式检测技术和芯片技术有机结合一起,是 20 世纪 90 年代中期由美国 Luminex 公司研制出的一种新型生物芯片。它既能够为后基因组时代的科学研究提供技术支持,又能提供高通量的新一代分子诊断技术平台。它是由许多不同标记的功能化微球,经过活化后连接上具有不同特异性结合能力的探针分子、特异性结合不同的生物分子、从而实现对不同分子的快速定性和定量检测。由于分子杂交是在悬浮溶液中进行的,检测速度快,因此也可以称为悬浮阵列(Suspension Array)<sup>[16]</sup>。

液相芯片的优点包括检测样品的多样性,因为微球表面可以包被各种生物大分子如蛋白、核酸等;敏感性好,微球表面的功能基团与抗原、抗体或核酸等以共价键的方式结合,只要表面有一定的功能基团量及保证一定的活化效率和抗体偶联效率,则会产生很强的信号,通过激光共聚焦荧光显微镜检测荧光,可以实现很高的灵敏度;检测速度快,因为是在悬浮的液相中进行,因此反应所需时间比较短,检测速度及效率比固相快了很多,并且蛋白质在液相环境,更有利于抗原抗体的结合,较之固相芯片假阳性少;灵活性好,可以根据测定需要调节每次

检测所需要的微球数量以及设计检测体系。

## 1.2 聚苯乙烯微球的合成

### 1.2.1 聚合物微球合成发展及其应用简述

单分散聚合物微球自从 1947 年被首次发现以来便逐步在各种领域发挥越来越重要的作用。最开始应用在涂料方面以解决容易剥落的问题；随后应用领域不断扩大，深入到计量、用作显微镜、电镜等仪器的标准粒子；用于高档油墨及化妆品的添加剂以提高其遮蔽力；分离填料方面用作高效液相色谱柱的填料，可以大大提高分离效果及其检测精确度；液晶显示屏用以距离保持剂及提高显示清晰度<sup>[17]</sup>。随着研究的深入，聚合物微球更广阔地应用在了生物、医药等更多的领域，各种粒径的微球在生物方面的应用可以通过表 1.1 清楚地分辨开来。同时也需要更多功能性微球，如表面连接羟基、羧基、氨基等功能基团的微球<sup>[18]</sup>，能够更高效地应用到生物医学、疾病检测等领域。

应用方面的发展促进了合成方法的发展改进。国内在上世纪 90 年代初也开始了对单分散聚苯乙烯微球的研制。张晓琴和由英才<sup>[19]</sup>分别在 1991 年和 1994 年采用种子聚合法制备了单分散性聚苯乙烯微球，2002 年王雅琼和罗正平等<sup>[20-21]</sup>对分散聚合法的工艺条件及影响因素做了详尽的阐述，2007 年王波和 2009 年王艳丽<sup>[22-23]</sup>采用无皂乳液聚合法制备得到单分散的聚苯乙烯微球。国际上 Lehigh 大学的 Vanderhoff 等人<sup>[24]</sup>在合成多孔微球方面做了很多的探讨，加拿大 Xerox 研究中心的 Ober 和 Lok 等人<sup>[25]</sup>在分散聚合的影响因素方面做了大量工作；挪威 Trondheim 大学的 Ugelstad 等人<sup>[26]</sup>在乳液聚合及种子溶胀方面做了很多卓有成效的工作；英国皇家科技及医学学院的 Arshady<sup>[27]</sup>对各种聚合方法聚合工艺进行了细致的阐述。

国际上也陆续出现了一些针对聚合物微球的代表性学术讨论会议<sup>[28]</sup>，主要有法国四年一届的“International Symposium on Polymers in Dispersed Media”；美国 Lehigh 大学两年一届的“Advances in Emulsion Polymerization and Latex Technology”；日本五年一届的“International Symposium on Advanced Technology of Fine Particles”，对聚合物微球的制备、表征以及相关的基础研究有着很大的推动作用。可见，聚合物微球的合成及应用已成为国内外学者致力于研究的热点之一<sup>[29-31]</sup>，并获得了引人注目的发展。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库